

p53 遺伝子転写活性化に対する *bcl-2* の 影響についての基礎的研究

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋子教授)

呉 哲 彦

p53 遺伝子はアポトーシスを誘導する作用を有することが示されており, 一方 *bcl-2* は種々の細胞に誘導されるアポトーシスを抑制する点において注目されている. *bcl-2* は p53 遺伝子誘導性のアポトーシスも抑制すると考えられているが, それらの相互作用について詳細な生化学的解明はなされていない. 生化学的には p53 遺伝子は転写因子としても作用し, DNA 損傷因子によるストレスに対してその活性が上昇する. 最近この p53 遺伝子の転写活性化に, -70~-40 塩基対 (base pair, bp) までのプロモーター領域が重要であるという報告がなされた. *bcl-2* については, アポトーシスを抑制する際, 抗酸化剤として作用するという考えが受け入れられてきた. そこで, アポトーシス誘導因子下での p53 遺伝子の転写活性化の制御に着目し, *bcl-2* がこれにおよぼす影響およびその機序についての検討を以下の実験にて行った. マウス繊維芽細胞 (L-TK) を用い, これに 2.4kb のヒト p53 プロモーター領域を有する, 合成 p53 クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) プラスミド p53RXBCAT をトランスフェクションし, アポトーシスを誘導する抗癌剤, 過酸化水素の刺激下における p53 遺伝子の転写活性化を CAT アッセイにて測定した. 用いられたほとんどの刺激により p53 遺伝子の転写活性化は上昇した. 過酸化水素では約 6 倍, フルオロウラシルでは約 9 倍の上昇を示した. SDS-PAGE-ウェスタンブロッティング法を用いて, L-TK-細胞の内在性 p53 蛋白の過酸化水素処理後の変化を解析した. 過酸化水素の刺激により, 7 時間, 24 時間後に p53 蛋白の発現量の増加を認めた. 過酸化水素に対する p53 遺伝子の転写活性化において基盤となるプロモーター領域を解析するため, 異なるプロモーター領域を有する p53 プラスミドを細胞にトランスフェクションし, 過酸化水素処理後の転写活性化を測定した. これにより, 過酸化水素刺激ではほぼ -70~-40bp までの領域が, p53 遺伝子の転写活性化に特に重要であることが示唆された. さらに -70~-40bp のなかで, 別の領域のプロモーターを有するプラスミドを作製し同様の測定をした. これでは, -70~-46bp までのプロモーター領域を使用した場合に p53 遺伝子の転写活性化が最も亢進した. p53 遺伝子の転写活性化に対する *bcl-2* の影響を検討するため, p53RXBCAT と *bcl-2* 発現ベクターを同時にトランスフェクションし, 過酸化水素およびフルオロウラシルで刺激後, p53 遺伝子の転写活性化を測定した. これでは, 過酸化水素およびフルオロウラシル刺激による p53 遺伝子の転写活性化の亢進がともに減少したのは, *bcl-2* を用いた例のみであり, 他の抗酸化剤では両刺激ともに明らかな減少は認められなかった. *bcl-2* の p53 遺伝子における作用領域について検討するために, -70~-40bp 領域のうち, -70~-46bp 領域の p53 プロモーターを持つプラスミドを *bcl-2* と同時にトランスフェクションし, 過酸化水素で刺激後の p53 遺伝子の転写活性化を測定した. *bcl-2* をトランスフェクションした例では転写活性化の減少が認められたが, 他の抗酸化剤を用いた例では p53 遺伝子の転写活性化の明らかな減少は認められなかった. 以上の結果から, p53 遺伝子の転写活性化はアポトーシス誘導因子により増強することが示された. *bcl-2* はアポトーシス誘導因子により上昇する p53 遺伝子の転写活性化を抑制するが, それは従来考えられていた抗酸化剤としてではなくそれ以外の機序によることが示唆された. さらに, この *bcl-2* による p53 遺伝子の転写活性化の制御は, -70~-46bp までの p53 の特定プロモーター領域への作用によることが示唆された.

Key words apoptosis, p53, *bcl-2*, transcriptional activation, antioxidants

p53 遺伝子は, ほとんどの癌で高頻度に変異を生じており, その変異が癌の増殖に関連していると考えられている¹⁾²⁾. 一方, その生理機能の一つとして, 紫外線や放射線として抗癌剤などにより DNA が損傷を受けると, 細胞の恒常性を維持するため細胞周期を G1 で停止させ³⁾, 続いてアポトーシスを誘導す

る機能を有することも示されている⁴⁾⁵⁾. *bcl-2* 遺伝子は, ヒト濾胞性リンパ腫に見られる, t(14;18)(q32;q21) 転座の転座点近傍に存在する癌遺伝子として発見され, その生理機能としては, 種々の細胞に誘導されるアポトーシスを抑制する点において注目されている⁶⁾⁷⁾. その中で, *bcl-2* 遺伝子は p53 遺伝子誘導

平成7年12月15日受付, 平成8年2月6日受理

Abbreviations: bp, base pair; CAT, chloramphenicol acetyl transferase; CPEp53, core promoter element p53; CPEp53-BP I, CPEp53 binding protein I; Dmt, deletion mutant; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, dimethyl sulphoxide; FCS, fetal calf serum; GSHPX, glutathione peroxidase; IL-6, interleukin-6; LSmt, Lincarc-scanning mutant; NAC, N-acetyl cysteine; PBS, phosphate-buffered saline

性的アポトーシスを抑制することも示されている。アポトーシスという現象に際して、これらの遺伝子はその生理機能面では相互作用を有するが、生化学的な相互作用の検討を加えた報告はなされていない。

p53 遺伝子の生化学的機能としては転写因子として作用し、また、DNA 損傷因子によるストレスに対して、その発現が上昇することも知られている¹⁰⁾¹¹⁾。最近、これらの刺激により誘導される p53 遺伝子の転写活性化に、-70~-40bp のプロモーター領域が重要であり、これを、コアプロモーターエレメント (core promoter element p53, CPEp53) と命名する報告がなされた¹²⁾。一方、*bcl-2* はアポトーシス制御の中では抗酸化剤として働くことが示されている¹³⁾¹⁴⁾。

本研究では、p53 遺伝子の転写活性の制御に着目し、アポトーシス誘導因子下で *bcl-2* が p53 遺伝子の転写活性化におよぼす影響、ならびに、*bcl-2* の抗酸化剤としての作用の可能性を検討した。同時に、*bcl-2* による p53 遺伝子転写活性制御における、CPEp53 の関連性についても検討した。

対象および方法

I. 細胞培養

実験に使用したマウス繊維芽細胞 (L-TK⁻) は、大阪大学細胞工学センター平野俊夫博士より提供を受けた。細胞は 5%CO₂ 気相下、10%牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) を添加した Dulbecco 変法 Eagle 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (日本製薬、東京) にて培養した。

II. アポトーシス誘導因子による p53 遺伝子の転写活性の測定

1. p53 遺伝子の転写活性の測定

アポトーシスを誘導する抗癌剤、過酸化水素の刺激下での p53 遺伝子の転写活性化を、2.4kb のヒト p53 プロモーター領域を有する合成 p53 クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) プラス

ミド (p53RXBCAT)¹⁵⁾、5μg を細胞にトランスフェクションし、アポトーシス誘導因子添加後 CAT アッセイ¹⁶⁾にて測定した。

2. アポトーシス誘導因子

アポトーシスを細胞に誘導させる刺激として¹⁷⁾¹⁸⁾、抗癌剤である、硫酸ビンデシン (塩野義、大阪)、塩酸ブレオマイシン (日本化薬、東京) 塩酸ドキソルビシン (協和発酵、東京) エトポシド (ブリストルマイヤーズスクイブ、東京) シスプラチン (ブリストルマイヤーズスクイブ)、マイトマイシン C (協和発酵、東京)、フルオロウラシル (協和発酵)、過酸化水素 (和光純薬、大阪) を用いた。

3. CAT アッセイ

CAT アッセイの方法を以下に示す。細胞を 60mm ディッシュに 1.6×10^6 個播種し、5%FCS 添加 DMEM 培地で24時間培養後、リポーター遺伝子 5μg をジエチルアミノエチルヘキストラン法¹⁹⁾でトランスフェクションした。トランスフェクションの効率を高めるために、90分後、10%ジメチルスルホキシド (dimethyl sulphoxide, DMSO) (SIGMA, St. Louis, USA) 含有 DMEM培地 2ml を添加、2分間静置した後、無血清 DMEM 培地にて洗浄、血清の p53 プロモーターへの影響を最小限に保つため²⁰⁾、これを無血清 DMEM 培地にて24時間培養した。培養後、抗癌剤、過酸化水素にて処理し 5%CO₂気相下でさらに培養した。ついで24時間後、細胞を採取し、超音波発生装置を用いて緩衝液 (0.25M Tris-HCL, pH7.8) 80μl 内でホモジネーションを行い、細胞内蛋白質を抽出した。抽出した蛋白質 100μg と、¹⁴C-クロラムフェニコール (25μCi/ml) (アマシャムジャパン、東京) 5μl と 4mM アセチルコエンザイム A 20μl を 37°C で90分間インキュベーションした後、シリカゲル TLC プレート (MERK, Darmstadt, Germany) に展開し、バイオイメージングアナライザー BAS1000 (FUJIX, 東京) で転写活性化を測定した。

III. 遺伝子導入細胞における p53 蛋白の解析

L-TK⁻細胞の内在性の p53 蛋白が過酸化水素で処理した後、

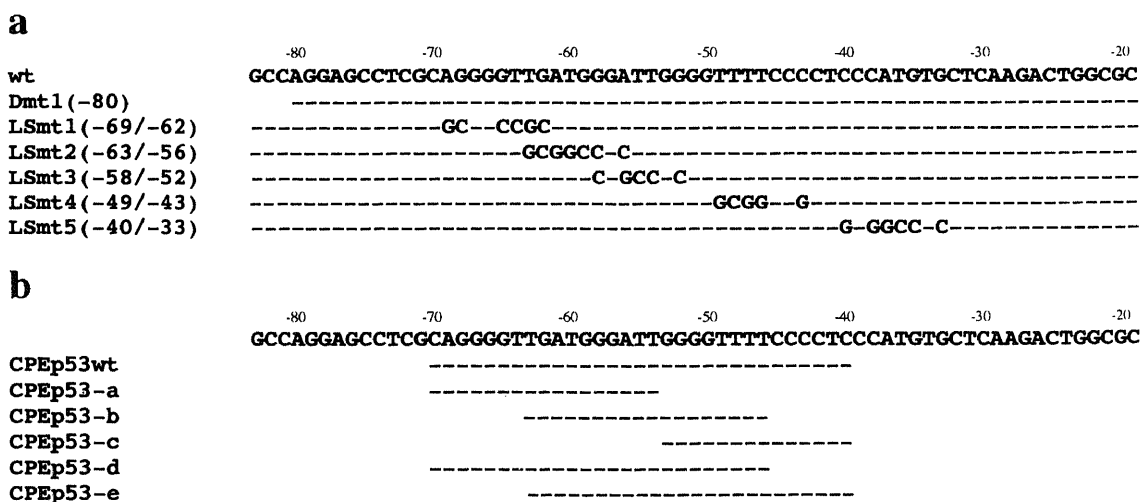


Fig. 1. The human p53 promoter sequence (from -83 to -19). The most 3' end of major transcription site for the human p53 gene as determined by Tuck and Crawford¹⁹⁾ is tentatively defined as +1 in this study. (a) The sequences of 5' deletion (Dmt) and linker-scanning (Lsmt) mutants of p53 promoter-CAT reporter genes are shown. Identical bases are shown by dashes. (b) The sequences of wild type p53 promoter core element are shown. CPEp53-a is p53 promoter sequence from -70 to -54. CPEp53-b is from -63 to -46. CPEp53-c is from -53 to -40. CPEp53-d is from -70 to -46. CPEp53-e is from -63 to -40.

どのように変化するかを、SDS-PAGE ウェスタンブロッティング法で解析した。60mm ディッシュに細胞を 1.6×10^6 個播種し、5%FCS 添加 DMEM 培地で24時間培養後無血清培地に換え、さらに24時間培養した。ついで過酸化水素 $300 \mu\text{M}$ 添加から、7時間後および24時間後に細胞を採取した。採取した細胞に緩衝液 (50mM リン酸カリウム, pH7.8) $50 \mu\text{l}$ を加え²¹⁾ ホモジネーションを行い、抽出した資料 $200 \mu\text{g}$ と、2-メルカプトエタノール (和光純薬) とを混和し 100°C にて2分間煮沸後、10% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。その後ゲルを ECL-ニトロセルロースフィルター (アマシャムジャパン) に転写した。つぎに、このフィルターを5%リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.4)-スキムミルク (雪印, 札幌) に 37°C で3時間静置し、ツイーン-20 (和光純薬) 加 PBS にて洗浄後、抗 p53 抗体 (Oncogene Science, NY, U.S.A.) と1時間反応させた。ついで同様に洗浄し、フィルターを西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 結合抗マウス IgG (アマシャムジャパン, 東京) と1時間反応させた。さらにフィルターをツイーン-20 加 PBS にて洗浄した後、ECL ウェスタンブロッティング検知液 (アマシャムジャパン) で反応させ、30秒間オートラジオグラフィーを行った。

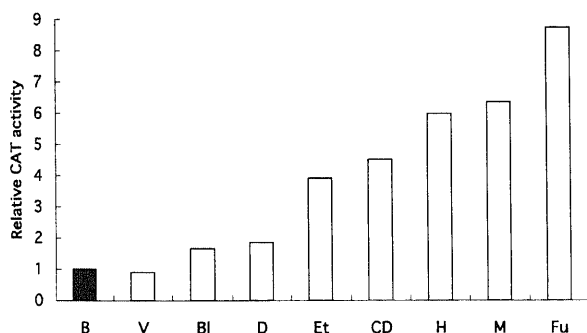


Fig. 2. Apoptosis inducing factors that induce the transcriptional activation of the p53 promoter. L-TK⁻ cells were transfected with p53RXBCAT reporter gene containing a 2.4 kb human p53 promoter region and were exposed to various agents known as apoptosis inducing factors. Cell extracts were prepared for CAT determination. CAT activities were described as the value relative to the basal CAT activity that was set at a value of 1. Cells were exposed to no stimuli for basal. B, basal; V, vindesine sulfate; BI, bleomycin sulfate; D, doxorubicin hydrochloride; Et, etoposide; CD, cisplatin; H, hydrogen peroxide; M, mitomycin C; Fu, fluorouracil.



Fig. 3. Western blotting analysis of endogenous p53 protein levels in L-TK⁻ cells following hydrogen peroxide exposure. Following hydrogen peroxide exposure, endogenous p53 protein levels in L-TK⁻ cells were elevated. The number above lane shows the hours after hydrogen peroxide was added.

IV. p53 プロモーター領域の解析

1. 異なるプロモーター領域を有する p53 プラスミドの作製¹²⁾

p53RXBCAT を鋳型として、-325 から +12 塩基対 (base pair, bp) までのプロモーター領域をもつプラスミド (p53CAT-325wt), および -80 から +12bp までのプラスミド欠失変異型 (deletion mutant 1, Dmt1) を作製した。ついで、リンカー変異導入法を用いて p53CAT-325wt の塩基配列を変異させ、これを CAT レポーター遺伝子の upstream に接続したプラスミド、リンカー変異型 (linker-scanning mutant, LSmt) 1~5 を作製した。さらにインターロキン-6 (interleukin-6, IL-6) 遺伝子の TATA ボックスだけを含む領域の upstream に、特定の p53 塩基配列を接続し CAT レポーター遺伝子に組み込んだプラスミド、CPEp53 を作製した²²⁾ (図1)。

2. p53 遺伝子転写活性化の測定

上記のプラスミド p53CAT-325wt および LSmt 1~LSmt 5 各々 $5 \mu\text{g}$ を、L-TK⁻ 細胞にトランスフェクションし過酸化水素 $300 \mu\text{M}$ で処理後、それらの転写活性化を CAT アッセイにて測定した。この結果をもとに、過酸化水素のストレスに対する p53 プロモーター活性化の中心領域を同定する目的で、CPEp53-b (-63~-46), CPEp53-c (-53~-40), CPEp53-d (-70~-46) 各々 $5 \mu\text{g}$, を用いて同様に転写活性化を測定した。

V. bcl-2 の p53 遺伝子転写活性化への影響

bcl-2 が p53 遺伝子の転写活性化にどのように影響を及ぼすかをみるために、細胞に p53RXBCAT $5 \mu\text{g}$ と bcl-2 発現ベクターを同時にトランスフェクションし、過酸化水素 $300 \mu\text{M}$ で刺激後、p53 遺伝子の転写活性化を CAT アッセイにて測定した。bcl-2 のコントロールとして、pEF-BOS ベクター²³⁾を使用した。その他、bcl-2 の代わりに抗酸化剤である N-アセチルシステイン (N-acetyl cysteine, NAC) 20mM および α -トコフェロール $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ を、過酸化水素刺激直後に培地中に添加した。さらに抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ

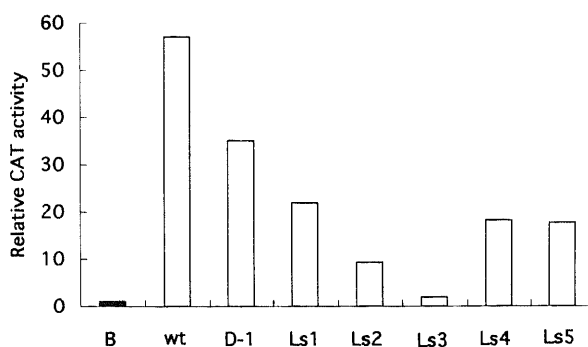


Fig. 4. Activation of different p53 promoter fragments and linker scanning p53 promoter mutants. Several p53 promoter fragments and mutants constructed from p53 RXBCAT were transfected into L-TK cells. p53 promoter activation in these cells were assayed by CAT determination following 24 hrs hydrogen peroxide exposure. CAT activities were described as the value relative to the basal CAT activity that was set at a value of 1. Decreased transcriptional activity of Ls2 and Ls3 were shown. B, basal; wt, p53CAT-325wt; D-1, Dmt1; Ls1, LSmt-1; Ls2, LSmt-2; Ls3, LSmt-3; Ls4, LSmt-4; Ls5, LSmt-5.

(glutathione peroxidase, GSHPX) と, Ref-1 発現ベクターを, *bcl-2* の場合と同様に p53RXBCAT と同時にトランスフェクションし p53 遺伝子の転写活性化を測定した. ついで同様の検討を, 過酸化水素のコントロールとしてフルオロウラシル 5 μ g/ml を用いて行った.

VI. *bcl-2* の p53 遺伝子に対する作用領域の検討

bcl-2 が p53 遺伝子に対する転写活性化に対し影響を及ぼす際, p53 プロモーター領域のどの配列領域に作用するのかを検討するため, 上記の CPEp53-d 5 μ g と *bcl-2* を細胞に同時にトランスフェクションし, 過酸化水素 300 μ M で刺激, その後の p53 遺伝子の転写活性化を CAT アッセイにて測定した. *bcl-2* のコントロールとして pEF-BOS, GSHPX, Ref-1 を用い同様に CAT アッセイを行った.

成 績

1. アポトーシス誘導因子刺激による p53 遺伝子の転写活性化

アポトーシス誘導因子刺激による p53RXBCAT の転写活性化を, CAT アッセイにて測定した結果, p53 遺伝子の転写活性化はコントロールの未刺激例と比べ, 塩酸ブレオマイシンと塩酸ドキソルビシン, および硫酸ビンデンシンを除いたその他の刺激により明らかに増強した (図 2). それぞれ約 2 倍から 9 倍であったが, このうち過酸化水素では約 6 倍, フルオロウラシル

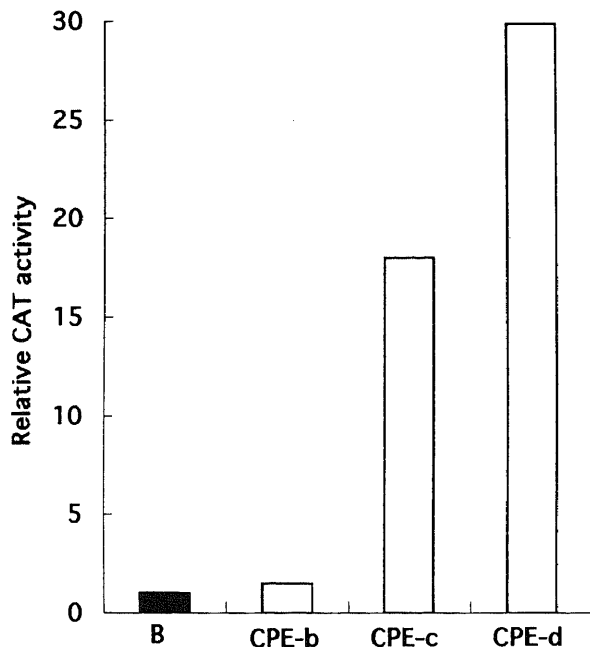


Fig. 5. Identification of p53 promoter regions required for hydrogen peroxide response. Cells were transfected with various plasmids containing p53 promoter subfragments. CPEp53-b containing fragment from -63 to -46 (CPE-b), CPEp53-c containing fragment from -53 to -40 (CPE-c), CPEp53-d containing fragment from -70 to -46 (CPE-d). p53 promoter activation in these cells were estimated with CAT determination following 24 hr hydrogen peroxide exposure. No hydrogen peroxide was added to cells for basal (B). CAT activities were described as the value relative to the basal CAT activity that was set at a value of 1. Cells with CPEp53-d showed highest promoter activation.

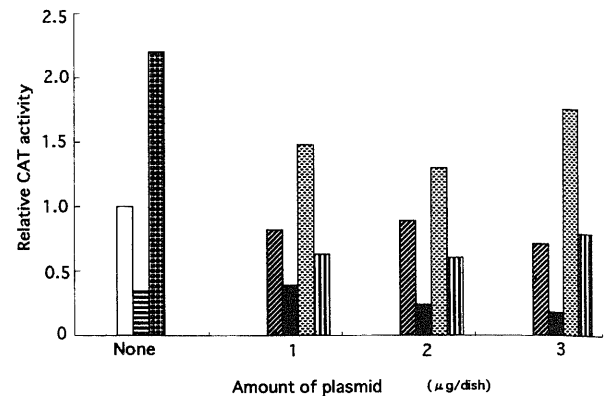


Fig. 6. Effects of Bcl-2 and other agents on hydrogen peroxide-induced p53 promoter activation. L-TK⁻ cells were exposed to hydrogen peroxide for 24 hr following p53RXBCAT transfection. N-acetyl cysteine (NAC) (20 mM) or α -tocopherol (To) (200 μ g/ml) was added or pEF-BOS vector, glutathione peroxidase (GSHPX), Ref-1 and *bcl-2* expression vectors were cotransfected. Cells were exposed to no stimuli (basal). pEF-BOS vector, *bcl-2*, GSHPX and Ref-1 were introduced into L-TK⁻ cells at 1, 2 and 3 μ g/dish, respectively p53 promoter activation was determined by a CAT assay. CAT activities were described as the value relative to the basal CAT activity that was set at a value of 1. p53 promoter activation were decreased in the cells transfected with *bcl-2*. \square , basal; \blacksquare , NAC; \bullet , To; \square , Vector; \blacksquare , *bcl-2*; \square , GSHPX; \blacksquare , Ref-1.

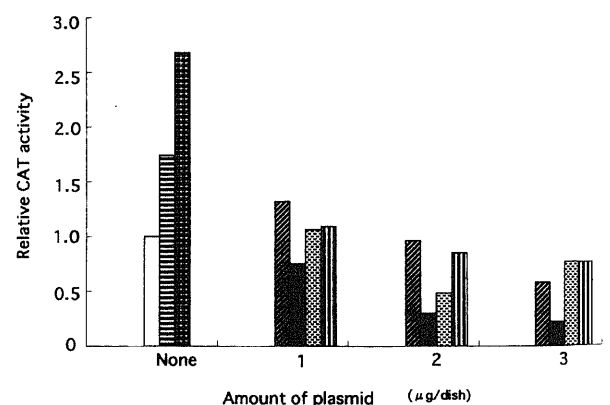


Fig. 7. Effects of Bcl-2 and other agents on fluorouracil-induced p53 promoter activation. L-TK⁻ cells were exposed to fluorouracil for 24 hr following 53RXBCAT transfection. N-acetyl cysteine (NAC) (20 mM) or α -tocopherol (To) (200 μ g/ml) were added or pEF-BOS vector, glutathione peroxidase (DSHPX), Fef-1 and *bcl-2* expression vectors were cotransfected. Cells were exposed to no stimuli (basal). pEF-BOS vector, *bcl-2*, GSHPX and Ref-1 expression plasmids were introduced into L-TK⁻ cells at 1, 2 and 3 μ g/dish, respectively p53 promoter activation was determined by a CAT assay. CAT activities were described as the value relative to the basal CAT activity that was set at a value of 1. p53 promoter activation was apparently decreased in the cells transfected with *bcl-2*. \square , basal; \blacksquare , NAC; \bullet , To; \square , Vector; \blacksquare , *bcl-2*; \square , GSHPX; \blacksquare , Ref-1.

では約 9 倍の転写活性の亢進を認めた。

II. p53 蛋白の解析

過酸化水素の刺激による、L-TK⁻細胞の内在性 p53 蛋白発現の変化を、ウェスタンブロッティング法により分析した結果、無刺激の例に比べ刺激後 7 時間、24 時間例では p53 蛋白の発現量の増加を認めた (図 3)。

III. 過酸化水素による p53 遺伝子の活性化に関わる p53 プロモーター領域の解析

p53RXBCAT を鋳型として作製した、異なるプロモーター領域を有するプラスミドを細胞にトランスフェクションし、過酸化水素の刺激下で測定した各々の転写活性をみると、-325 から +12bp までの塩基配列を有するプラスミド p53CAT-325 wt, および -80 から +12bp までの塩基配列を有するプラスミド Dmt 1 では、p53RXBCAT と比べさらに増強された転写活性の上昇を認めた (図 4)。ついで p53CAT-325wt の、-80bp までの領域に変異を導入したプラスミド LSmt 1, 2, 3, 4, 5 では、LSmt 1, 4, 5 において比較的高い転写活性化の上昇を呈したが、-63~-52bp 内での変異導入を行った LSmt 2, 3, 特に LSmt 3 で活性化の上昇は殆ど認められなかった。このことから、大凡 -70 から -40bp までの領域が、過酸化水素刺激による p53 遺伝子活性化のための、p53 プロモーターの活動に特に重要であると考えられた。

p53 プロモーター活性に関連している塩基配列を、さらに選定するために CPEp53 を種々の領域に分け、このうち図 1 に示す CPEp53b, c, d について、過酸化水素に対する活性の反応を検討した。-70 から -46bp までの CPEp53d において p53 遺伝子の転写活性化は最も上昇した (図 5)。

IV. bcl-2 による p53 遺伝子転写活性化への影響

bcl-2 の p53 遺伝子転写活性化への影響およびその作用機序を検討するために、アポトーシス誘導因子より過酸化水素とフ

ルオロウラシルを選び、両刺激下での bcl-2 と p53 遺伝子の関係を調べた (図 6)。bcl-2 発現ベクターを同時にトランスフェクションし発現させた例では、過酸化水素で増強すると考えられる p53 遺伝子の転写活性化が、コントロールのベクターと比べ減少した。抗酸化剤として作用すると考えられている NAC, α -トコフェロール, GSHPX, Ref-1 を用いた場合では、NAC 使用例では p53 遺伝子転写活性化は減少したが、その他の α -トコフェロール, GSHPX, Ref-1 を用いた例では、bcl-2 と比較し、p53 遺伝子の転写活性化の減少は認められなかった。また、過酸化水素に変えフルオロウラシルを刺激とした場合 (図 7)、bcl-2 発現ベクターをトランスフェクションした例で、過酸化水素の場合と同様 p53 遺伝子の転写活性化は減少したが、その他の例では p53 遺伝子の転写活性化に著明な減少は見られなかった。

V. bcl-2 の p53 転写活性化への影響に関するプロモーター領域の検討

CPEp53-d と bcl-2, pEF-BOS ベクター, GSHPX, Ref-1 を同時に細胞にトランスフェクションした場合の p53 遺伝子の転写活性化をみると、bcl-2 例では転写活性化の減少が認められたが、pEF-BOS ベクター, GSHPX, Ref-1 を用いた例では明らかな活性化の減少は見られなかった (図 8)。

考 察

アポトーシスは、細胞が恒常性を維持するための細胞死の機構の一つであり、癌を始め種々の疾患の発生に関与している。Kerr ら²⁴⁾が初めて報告して以来、臨床および基礎医学の各分野で研究が進められてきた。

分子生物学の分野でもその機構について多様な研究がなされ、複数の遺伝子とその機序を制御していることが明らかにされている。p53 遺伝子は、多くの癌で高頻度に変異を起こしていることが知られているが³¹⁾、その生理機能は、放射線や薬剤などにより DNA が損傷を受けると細胞の恒常性を維持するため、細胞周期を G1 で停止させることであると考えられている³⁾。また、正常型 p53 遺伝子導入実験や、p53 遺伝子欠損胸腺細胞などの研究から、アポトーシスを誘導する活性があることが示された^{4)~7)}。これらの機能と合わせて p53 遺伝子は転写因子としても働き、紫外線や放射線、あるいは抗癌剤などの DNA 損傷因子によりその活性が高められることも知られている¹⁰⁾¹¹⁾。

一方、bcl-2 は、多くのヒト濾胞性リンパ腫に見られる t(14; 18)(q32; q21) 転座の転座点近傍に存在する癌遺伝子として発見された。bcl-2 の発現は比較的広範な組織で見られるが、特にリンパ系や、神経系において顕著である²⁵⁾²⁶⁾。生理機能としては、Vaux ら²⁷⁾が、1988年に Bcl-2 蛋白質の過剰発現がリンパ球の (細胞死) アポトーシスを抑制することを示して以来、現在は種々の刺激により各種の細胞に誘導されるアポトーシスを抑制する遺伝子であることが知られている²⁸⁾。その他、抗癌剤によるアポトーシスの誘導に着目した報告では、p53 遺伝子と bcl-2 が薬剤の効果に影響を与え、その発現が耐性や予後に関連しているのではないかと考えられている^{28)~30)}。この様に、生理作用として p53 遺伝子と bcl-2 はアポトーシスという現象の中で相反する作用を有しており、さらに bcl-2 は p53 遺伝子によるアポトーシスの誘導を抑制することも示されている³¹⁾。

しかしながら、これらを生化学的側面からみた場合、p53 遺

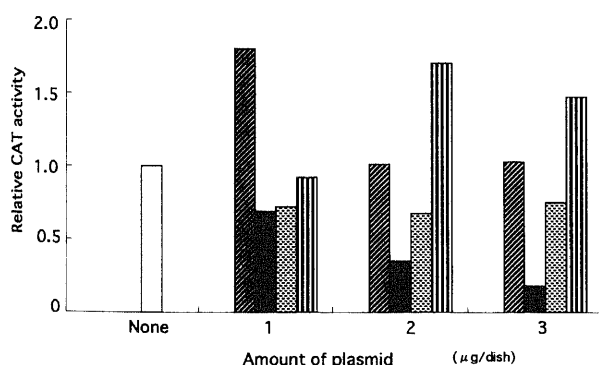


Fig. 8. Effects of Bcl-2 and other agents on hydrogen peroxide-induced CPEp53-d promoter activation. L-TK⁻ cells were exposed to hydrogen peroxide for 24 hr following CPEp53-d transfection. pEF-BOS vector, glutathione peroxidase (GSHPX), Ref-1 and bcl-2 expression vectors were added. Cells were exposed to no stimuli for basal. pEF-BOS vector, bcl-2, GSHPX and Ref-1 expression plasmids were introduced into L-TK⁻ cells at 1, 2 and 3 μg/dish, respectively CPEp53-d promoter activation was determined by a CAT assay. CAT activities were described as the value relative to the basal CAT activity that was set at a value of 1. p53 promoter activation were apparently decreased in the cells cotransfected with bcl-2. □, basal; ■, Vector; ▨, bcl-2; ▩, GSHPX; ▪, Ref-1.

伝子, *bcl-2*, そして, これら 2 つの相互作用のメカニズムに関しての詳細な説明はいまだなされていない. *p53* 遺伝子については, その生理学および生化学的機能については報告されつつあるが, 遺伝子の発現誘導が, どのような機序により引き起こされるかは明らかにされていなかった. また, *bcl-2* に関しては, 作用機序についての詳細な説明はなされていないが, *Bcl-2* が抗酸化剤として作用することによりアポトーシスを抑制しているという考えが受け入れられていた¹³⁾¹⁴⁾. 種々の刺激によってアポトーシスを誘導するシグナルが細胞に伝えられることにより, 細胞内で活性酸素が合成され, その細胞傷害作用によりアポトーシスが誘導され, 細胞は死に至る. この活性酸素による経路は全てのアポトーシスに至る共通経路であり, *Bcl-2* がこれに対して抗酸化剤として働くことで, アポトーシスが抑制されるという考え方である. しかしながら最近の知見では, この考えは必ずしも *bcl-2* の活性機序を全て説明しているわけではなく, 活性酸素を要する経路はアポトーシスへ至る過程のひとつであること, 低酸素および無酸素状態で誘導されるアポトーシスでは活性酸素は関与せず, *bcl-2* はこの活性酸素を介さない機構でも細胞死を抑制することが示された^{32)~35)}. 本研究においては, アポトーシス誘導因子存在下における, *p53* 遺伝子の転写活性化に対する *bcl-2* の影響および, その際 *Bcl-2* が抗酸化剤として作用する可能性を検討した. さらに, *p53* 遺伝子における *bcl-2* の作用領域についての検討も行った.

アポトーシスを誘導する因子は遺伝子に有害なストレスでもあり, *p53* 遺伝子はこれらの刺激に対して, その細胞内の蛋白レベルが上昇する. 最近, それは転写の活性化も伴っており mRNA レベルでの発現の上昇が同時に起こっていることが示された¹³⁾. 本研究では, mRNA レベルでの確認は行っていないが, CAT アッセイにより種々のアポトーシス誘導因子で *p53* プロモーターの転写活性の上昇をみとめた. ウェスタンブロッティング法により過酸化水素によってその蛋白レベルの上昇が確認できたことから, この現象は mRNA レベルおよび蛋白レベルで生じている可能性も考えられる.

Sun ら¹³⁾ は, DNA 損傷因子に対する反応として誘導される *p53* 遺伝子の転写活性化では, -70~-40bp までの *p53* プロモーター領域が基盤となるとして, これを CPEp53 と命名した. 本研究における過酸化水素に対する *p53* 遺伝子の反応でも, -70~-40bp までのプロモーター領域が転写の活性化に重要であることが確認された. また, フルオロウラシルでも同様のことが確認されている. さらに検討をすすめた結果, 過酸化水素に関しても, -70~-46bp のプロモーター領域 (CPEp53-d) が *p53* 遺伝子の転写活性化に最も必要であることが示唆された.

過酸化水素と, フルオロウラシル刺激下で, *bcl-2* を同時に細胞へトランスフェクションすると *p53* 遺伝子の転写活性化が減少したことから, *bcl-2* により *p53* プロモーターの転写活性化が抑制されたと考えられる. 一方, 抗酸化剤としての作用を有する α -トコフェロール, GSHPX, Ref-1 では両因子刺激下において, *p53* 遺伝子の転写活性化の減少が見られなかった. NAC に関しては, 過酸化水素下で *p53* 遺伝子の転写活性化を減少させたが, フルオロウラシル下では転写活性化の減少は認めなかった. *bcl-2* が抗酸化剤として作用するならば, NAC, GSHPX などと同様の影響を *p53* 遺伝子の転写活性化に及ぼす

と考えられるが, ここでは *bcl-2* のみが双方の刺激による *p53* 遺伝子の活性を抑制していた. このことから, *bcl-2* の作用機序に抗酸化剤としての機能以外の可能性があると推察される.

p53 プロモーターの転写活性化が *bcl-2* により抑制されることが明らかになったが, ついで *bcl-2* の *p53* プロモーターにおける作用領域を検討した. *bcl-2* および, 抗酸化剤の CPEp53-d の転写活性化に対する影響を調べたところ, *bcl-2* のみが CPEp53-d の転写活性化を明確に抑制することが示された.

これらの結果から, *bcl-2* は抗酸化剤としての機能以外の経路で *p53* 遺伝子の転写活性化を抑制し, それは *p53* プロモーター領域内の -70~-46bp までの領域に対する作用に関連していることが示唆された.

Sun ら¹³⁾ は, CPEp53 に結合する核内因子として新しい蛋白 (CPEp53 binding protein 1, CPEp53-BP 1) を同定した. 一方, *bcl-2* 遺伝子の細胞へのトランスフェクションにより *Bcl-2* 蛋白の産生を我々はウェスタンブロッティング法により確認している (データ未掲載). この CPEp53-BP 1 に *Bcl-2* 蛋白が作用し, *p53* 遺伝子の転写活性化が抑制されるのかは今後の検討が必要である.

アポトーシス制御の機構はいまだ複雑であるが, その基礎, 臨床医学的重要性は大きく, 今後さらなる研究がすすめられるものと考えられる. 関連遺伝子は種々同定されつつあるが, その詳細については未解明な点が多い. 本研究ではこれらの関連遺伝子の相互作用として, *bcl-2* は *p53* 遺伝子の外的ストレスに対する転写活性化を抑制するが, その際, *bcl-2* は従来考えられてきた抗酸化剤としてではなく, それ以外の機序で作用する可能性が示された. また, 同時に *bcl-2* が働くのは *p53* 遺伝子の特定プロモーター領域 -70~-46bp であることも示唆された.

結 論

アポトーシス誘導因子下における *p53* 遺伝子の転写活性化に対し, *bcl-2* の及ぼす影響およびその機序について研究し, 以下の知見を得た.

1. *p53* 遺伝子の転写活性化はアポトーシス誘導因子による刺激により, 未刺激例と比較して約 2~9 倍に上昇した. 過酸化水素では約 6 倍, フルオロウラシルでは約 9 倍まで転写活性化が上昇した.

2. *p53* 遺伝子のはぼ -70~-40bp までのプロモーター領域に変異を導入すると, 変異を導入しない例と比較し, 過酸化水素による *p53* 遺伝子の転写活性化はその上昇が抑制された.

3. 過酸化水素およびフルオロウラシル双方による *p53* 遺伝子の転写活性化は, *bcl-2* により減少したが, 抗酸化剤である NAC では過酸化水素による転写活性のみが減少し, α -トコフェロールや抗酸化酵素である GSHPX, Ref-1 では双方とも減少しなかった.

4. -70~-46bp までの *p53* プロモーター領域の過酸化水素による転写活性化は, *bcl-2* により減少したが, GSHPX, Ref-1 では減少しなかった.

以上より, *bcl-2* はアポトーシス誘導因子により上昇する *p53* 遺伝子の転写活性化を抑制するが, それは従来考えられていた抗酸化剤としてではなくそれ以外の機序によることが示唆された. さらに, この *bcl-2* による *p53* 遺伝子の転写活性化の

制御は、-70~-46bp までの p53 の特定プロモーター領域への作用によることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を戴きました金沢大学がん研究所病態生理部山本健一教授に深謝致します。さらに、本研究の遂行にあたり御協力を賜りました金沢大学外科学第一講座の皆様、および金沢大学がん研究所病態生理部の教室員の皆様に心から感謝致します。

文 献

- 1) Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C.: p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53 (1991).
- 2) Vogelstein, B. & Kinzler, K. W.: p53 function and dysfunction. *Cell*, **70**, 523-526 (1992).
- 3) Lane, D. P.: Guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16 (1992).
- 4) Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. & Oren, M.: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, **352**, 345-347 (1991).
- 5) Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sordat, B. & Costa, J.: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4495-4499 (1992).
- 6) Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A. & Jacks, T.: p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, **362**, 847-849 (1993).
- 7) Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L. & Wyllie, A. H.: Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, **362**, 849-852 (1993).
- 8) Reed, J. C.: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.*, **124**, 1-6 (1994).
- 9) Strasser, A., Harris, A. W., Jacks, T. & Cory, S.: DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by bcl-2. *Cell*, **79**, 329-339 (1994).
- 10) Fritsche, M., Haessler, C. & Brandner, G.: Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene*, **8**, 307-318 (1993).
- 11) Maltzman, W. & Czyzyk, L.: UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1689-1694 (1984).
- 12) Sun, X., Shimizu, H. & Yamamoto, K.: Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4489-4496 (1995).
- 13) Hockenbery, D. M., Oltavi, Z. N., Yin, X. M., Millian, C. L. & Korsmeyer, S. J.: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, **75**, 241-251 (1993).
- 14) Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T. & Bredesen, D. E.: Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, **262**, 1274-1277 (1993).
- 15) Tuck, S. P. & Crawford, L.: Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 2163-2172 (1989).
- 16) Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H.: Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.*, **2**, 1044-1051 (1982).
- 17) 黒川博一, 西篠長宏: 抗癌剤とアポトーシス. *J. Jpn. Cancer Ther.*, **30**, 905-914 (1995).
- 18) Barry, M. A., Behneke, C. A. & Eastman, A.: Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 2353-2362 (1990).
- 19) Lopata, M. A., Cleveland, D. W. & Sollner-Webb, B.: High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 5707-5717 (1984).
- 20) Reich, N. C. & Levine, A. J.: Growth regulation of a cellular tumor antigen, p53, in nontransformed cell. *Nature*, **308**, 199-201 (1984).
- 21) Graeber, T. G., Peterson, J. F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A. J. Jr. & Giaccia, A. J.: Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 6264-6277 (1994).
- 22) Shumizu, H., Mitomo, Watanabe, T., Okamoto, S. & Yamamoto, K.: Involvement of an NF- κ B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol. Cell Biol.*, **10**, 561-568 (1990).
- 23) Mizushima, S. & Nagata, S.: pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 5322 (1990).
- 24) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257 (1972).
- 25) Eguchi, Y., Ewert, D. L. & Tsujimoto, Y.: Isolation and characterization of the chicken bcl-2 gene: expression in a variety of tissues including lymphoid and neuronal organs in adult and embryo. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4187-4192 (1992).
- 26) Hockenbery, D. M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. & Korsmeyer, S. J.: Bcl2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6961-6965 (1991).
- 27) Vaux, D. L., Cory, S. & Adams, J. M.: Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**, 440-442 (1988).
- 28) Walton, M. I., Whysong, D., O, Connor, P. M., Hockenbery, D., Korsmeyer, S. J. & Kohn, K. W.: Constitutive expression of human bcl-2 modulates nitrogen

mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res.*, **53**, 1853-1861 (1993).

29) Miyashita, T. & Reed, J. C.: Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*, **81**, 151-157 (1993).

30) Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T. & Housman, D. E.: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, **74**, 957-967 (1993).

31) Chiou, S. K., Rao, L. & White, E.: Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 2556-2563 (1994).

32) 恵口 豊, 清水重臣, 辻本賀英: アポトーシスにおける

bcl-2 の機能. *実験医学*, **13** (増刊), 1828-1833 (1995).

33) Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y.: Prevention of hypoxia-induced cell death by bcl-2 and bcl-xL. *Nature*, **374**, 811-813 (1995).

34) Jacobson, M. D. & Raff, M. C.: Programmed cell death and bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature*, **374**, 814-816 (1995).

35) Muschel, R. J., Bernhard, E. J., Garza, L., McKenna, W. G. & Koch, C. J.: Induction of apoptosis at different oxygen tensions: evidence radicals do not mediate apoptotic signaling. *Cancer Res.*, **55**, 995-998 (1995).

Effect of Bcl-2 on p53 Promoter Activation Tetsuhiko Go, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., **105**, 249—256 (1996)

Key words apoptosis, p53, bcl-2, transcriptional activation, antioxidants

Abstract

The p53 tumor suppressor gene induces apoptosis and the *bcl-2* proto-oncogene inhibits it. However, the biochemical mechanism underlying the regulation of apoptosis by these two genes remains largely unknown. The p53 promoter region from -70 to -40bp is reportedly required for p53 basal promoter activity and p53 promoter activation. *bcl-2* has been reported to function in the antioxidant pathway to prevent apoptosis. Herein, we investigated the effect of *bcl-2* on p53 promoter activation and the mechanism of its effect. Mouse L-TK⁻ cells were transfected with the original p53 promoter-chloramphenicol acetyl transferase (CAT) fusion plasmid (RXBCATp53) and were exposed to various apoptosis inducing agents. p53 promoter activation was determined by a CAT assay. Hydrogen peroxide and fluorouracil elevated transcriptional activity 6-fold and 9-fold, respectively, Western blot analysis revealed elevation of the p53 protein in the cells under hydrogen peroxide stimulation. The results of CAT assay of the cells transfected with plasmids containing different p53 promoter regions indicated that the promoter region from -70 to -40bp, especially the region from -70 to -46bp, is required for p53 basal promoter activity and p53 promoter activation by hydrogen peroxide. p53 (RXBCATp53) promoter transcriptional activation by both hydrogen peroxide and fluorouracil were apparently decreased in the cells cotransfected with *bcl-2*, but not in the cells treated or cotransfected with other antioxidants such as N-acetyl cysteine, α -tocopherol, glutathione peroxidase and Ref-1. This indicates that *bcl-2* suppress p53 promoter activation not only in the antioxidant pathway but also in another pathway. The activation of the p53 promoter region from -70 to -46bp by hydrogen peroxide was also decreased in the cells cotransfected with *bcl-2*, but not with other antioxidants. These findings suggest that the increased p53 promoter activation by apoptosis inducing agents is suppressed by *bcl-2* not in the antioxidant pathway but another pathway by acting on the specific promoter region from -70 to -46bp of p53.